ACTION FONGISTATIQUE ET FONGICIDE DE SIX BIOCIDES UTILISÉS DANS LE TRAITEMENT DE BOIS ARCHÉOLOGIQUES CONTAMINÉS.

P. GUIRAUD *, J.L. BENOIT-GUYOD *, R. STEIMAN *, Q.K. TRAN **

* Groupe pour l'Étude du Devenir des Xénobiotiques dans l'Environnement (GEDEXE), UFR de Pharmacie de Grenoble (UJF), BP 138, 38243 Meylan Cedex, France.
** ARC Nucléart, Centre d'Études Nucléaires de Grenoble, BP 85X, 38041 Grenoble Cedex, France

RÉSUMÉ — Les bois archéologiques gorgés d'eau sont très sensibles à l'attaque par les microorganismes. Un bateau datant de 1680 a été exhumé en juin 1990 à Bouliac près de Bordeaux (France). Sa restauration a été confiée à l'équipe de ARC Nucléart à Grenoble (France), spécialisée dans le développement de procédés de conservation d'objets archéologiques. Malgré de nombreuses précautions, des moisissures se sont développées sur différentes parties du bateau en février 1994. En dépit d'un reconditionnement du bois, ces moisissures sont réapparues très rapidement. Différents échantillons ont été prélevés, aussi bien dans les zones visiblement contaminées, que dans des zones sans contamination apparente. La sensibilité de 7 espèces, représentatives des différents groupes taxonomiques présents, a été recherchée vis-à-vis de 6 biocides commerciaux contenant différentes classes de matières actives, en prenant pour référence le pentachlorophénol. Les concentrations minimum inhibitrices et létales ont été déterminées.

ABSTRACT — Numerous microorganisms grow on waterlogged archeological woods leading to their deterioration. Microbial proliferation should be avoided by the use of one or several biocides. In a previous study, we surveyed the mycoflora found in a waterlogged boat from the end of the 17th century, discovered in 1990 near Bordeaux (Bouliac, France). In this work, 7 species, representative of the different taxonomic groups isolated and identified from small wood samples, have been checked for their sensitivity towards six commercial biocides containing various classes of active compounds. The minimal inhibitory concentrations and the minimal lethal concentrations have been determined for each biocide.

MOTS CLÉS : Bois archéologiques, dégradation, micromycètes, moisissures, conservation

KEY WORDS : Archeological wood, degradation, micromycetes, preservation

INTRODUCTION

La préservation et la restauration des objets archéologiques, historiques et des objets d'Art est un problème très complexe en raison de la multitude des types d'agressions possibles et également de la diversité des matériaux à protéger. Plusieurs centres de recherche se sont spécialisés dans ce domaine.

Nucléart est un service du Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA), implanté au Centre d'Études Nucléaires de Grenoble (CENG) et lié à l'Atelier Régional de Conservation (ARC), formant le groupe ARC-Nucléart. Ce groupe est spécialisé dans le traitement et la restauration d'objets archéologiques, en particulier les bois gorgés d'eau. Différents procédés sont utilisés : le séchage par lyophilisation après imprégnation par du polyéthylèneglycol (PEG) (Young & Wainwright, 1982 ; Cook & Grattan, 1984 ; Hoffmann, 1984 ; Jannière & Meurgues, 1984), la consolidation selon le procédé Nucléart (imprégnation par des résines styrène-polyester puis polymérisation par irradiation gamma) ou imprégnation partielle ou totale par des polymères synthétiques (de Tassigny & Ginier-Gillet, 1979 ; Ginier-Gillet *et al.*, 1984).

Le problème majeur est le stockage des pièces avant traitement car sorties de leur milieu d'immersion, les matériaux organiques sont altérés rapidement par les nouvelles conditions physico-chimiques dans lesquelles ils se trouvent (oxydations...) ainsi que par les insectes et les microorganismes. La procédure la mieux adaptée consiste à essayer de maintenir au mieux les conditions dans lesquelles ont été découvertes les pièces, en les plaçant en milieu immergé à l'obscurité. Cependant, il est souvent plus facile de stocker les bois gorgés d'eau dans des gaines étanches saturées en eau en chambre froide à 6° C. Dans ce cas, les contaminants présents lors du conditionnement peuvent se développer si l'on n'utilise pas des techniques de désinfection ou de stérilisation telles que des biocides chimiques ou bien les radiations gamma (Pointing *et al.*, 1994). Les bois archéologiques gorgés d'eau sont donc la cible de nombreux microorganismes (bactéries et micromycètes) susceptibles de les dégrader. L'emploi d'une ou de plusieurs méthodes biocides de différentes natures permet, en principe, de stopper la prolifération microbienne soit par un effet inhibiteur, soit par un effet létal.

Dans ce travail, nous avons testé l'efficacité de plusieurs biocides chimiques couramment utilisés contre différentes espèces de micromycètes isolés à partir de bois gorgé d'eau. L'influence du PEG a été étudiée.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Le bateau de Bouliac :

En juin 1990 à Bouliac près de Bordeaux, deux embarcations de bois gorgé d'eau ont été exhumées. L'une datant de 1680, la plus grande, a été confiée pour traitement à Arc-Nucléart à Grenoble. Le matériau dans lequel se trouvaient les bateaux est hétérogène, il s'agit d'argile, de sable, de graviers et de blocs de pierres. Dès leur exhumation, l'arrosage a été régulier pour éviter le dessèchement. La grande embarcation a été démontée, les fragments ont été lavés sur place puis enrobés de linges humides et conditionnés dans de la gaine étanche de polyéthylène noire pour la protection contre les rayons solaires. Une solution de biocide (Bactolyse) est introduite puis la gaine est soudée par thermocollage.

Les pièces seront ensuite stockées en chambre froide à +6° C au CENG, jusqu'en février 1994 date à laquelle il est noté un développement de moisissures sur de nombreuses pièces ornées de clous qui ont troué la gaine. Les pièces sont alors reconditionnées (souvent dans les mêmes gaines) après nettoyage et pulvérisation d'une solution de Bactolyse à 1 %. Malgré ces précautions, des microorganismes réapparaissent même lorsque la gaine a été changée et des prélèvements sont effectués en avril 1994 sur différentes parties du bateau.

Espèces fongiques étudiées :

Parmi les micromycètes isolés des prélèvements de bois effectués en 1994, sept ont été étudiés : un Ascomycète : *Chaetomium globosum* Kunze : Fries ; un Basidiomycète : *Pholiota abstrusa* (Fries) Singer *sensu* Singer ; cinq Deutéromycètes : *Acremonium persicinum* (Nicot) W. Gams, *Gliocladium virens* J.H. Miller *et al.*, *Penicillium chrysogenum* Thom, *Phialophora lignicola* (Nannfeldt) Goidanich et *Trichoderma viride* Persoon : Fries.

Biocides utilisés :

Les biocides testés sont des composés à large spectre (algicides, bactéricides, fongicides), commercialisés en solution aqueuse : Bactolyse 48 (B48) est un mélange de deux dérivés isothiazoline et de nitrate de cuivre, Bactolyse 66 (B66) est un mélange de deux dérivés isothiazoline et d'un dérivé bromo-nitré, Kathon CG contient les mêmes principes actifs que B48 mais 10 fois plus dilués. Luxor D2 est un ammonium quaternaire et JB75 est un sel de phosphonium. Le produit antifongique de référence est le sel de sodium du pentachlorophénol (PCPNa). Les produits sont testés à des concentrations finales de 0,01 à 3 g/l sauf le JB75 : de 1 à 60 g/l (g de solution commerciale dans de l'eau distillée stérile). Ces gammes de concentrations sont préparées de manière à encadrer la concentration d'utilisation préconisée par le fabricant (0,1 % soit 1 g/l pour B48, 1 à 5 % soit 10 à 50 g/l pour JB75).

B48, B66 et JB75 proviennent de chez JOUD, France ; Kathon CG de chez ROHM et HAAS (Allemagne), Luxor D2 de chez VIATIK (France) et PCPNa de chez ALDRICH (Allemagne).

Essais préliminaires :

Pour deux des espèces choisies (*Gliocadium virens* et *Trichoderma viride*), l'action de B48 (0,25 à 3 g/l) et de JB75 (10 à 30 g/l) a été étudiée sur un milieu solide (glucose 8 %, extrait de levure 1,5 %, agar 1,5 %). Les micromycètes ont été ensemencés en un point central dans les boîtes de Pétri puis la croissance a été évaluée par mesure du diamètre des colonies lors d'une incubation à 22° C pendant 15 jours sous un éclairage type lumière du jour avec une photopériode de 12h/24h.

Détermination des CMI et CML :

Pour chaque espèce, des précultures sont réalisées en boîte de Pétri sur milieu malt (1,5 %) -agar (1,5 %) (MEA) pendant 8 à 10 jours à 22° C. Puis des suspensions calibrées de spores sont préparées : 10^6 spores/ml dans de l'eau distillée stérile additionnée de tween 80 (0,5 %). Les tests de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont réalisés en plaques multipuits (96 puits). Chaque puits contient 170 ml de milieu synthétique de Galzy et Slonimski (1957) (5 g/l de glucose) additionné ou non de 20 % de PEG 400, 10 ml de suspension de spores, 20 ml de solution de biocide ; chaque essai est répété 8 fois (une colonne) ; le blanc correspond à une colonne ne contenant que du milieu de culture ; la colonne témoin ne contient pas la solution de biocide. Les microplaques sont ensuite incubées à 22° C sous agitation (180 rpm) et la croissance est évaluée par mesure de la densité optique à 620 nm à 24, 48 et 72h (spectrophotomètre Multiscan). Les concentrations minimales létales sont déterminées après transfert du

contenu des puits à 72h de culture sur milieu MEA en boîtes de Pétri et observation du développement de colonies ou non.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les 7 micromycètes étudiés ont été choisis comme représentants des différents groupes taxonomiques présents sur les échantillons de bois archéologique gorgé d'eau et en fonction de la fréquence de leur isolement. Toutes ces espèces sont ubiquistes, trouvées dans le sol mais fortement liées au bois ou à ses sous produits.

En ce qui concerne les biocides utilisés, le PCPNa est très couramment employé dans des domaines très divers : industrie, agriculture... mais il présente l'inconvénient de s'accumuler dans les écosystèmes et sa toxicité n'est pas négligeable. Les 5 autres produits testés sont présentés comme moins nocifs. Un traitement par du PEG est employé lors de la déshydratation ménagée des objets en bois gorgé d'eau. Ce traitement consiste à immerger les pièces de bois dans des solutions aqueuses de PEG en concentration croissante, chaque immersion est très lente et peut durer plusieurs mois, c'est pourquoi l'influence de ce produit sur l'efficacité des biocides a été recherchée.

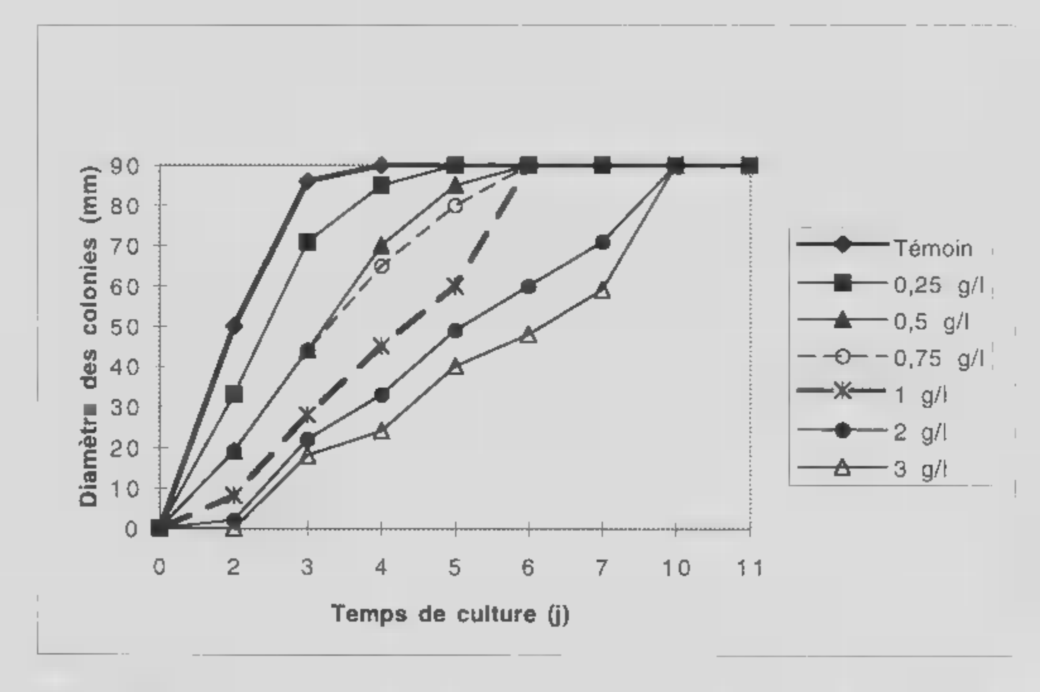


Fig. 1. — Croissance de *Trichoderma viride* sur le milieu solide en présence de différentes concentrations de B48.

Fig. 1. — Growth of *Trichoderma viride* on solid medium with variable concentrations of B48.

Les essais préliminaires de sensibilité de *Gliocladium virens* et *Trichoderma viride* vis à vis de B48 et JB75 réalisés sur milieu solide, montrent que ces deux micromycètes sont capables de se développer jusqu'à 3 g/l de B48, le plus résistant étant *T. viride* qui est capable d'envahir la boîte de Pétri en 10 jours lorsque le milieu contient 3 g/l de B48 contre 4 jours pour la culture témoin (Fig. 1). Pour *G. virens* avec la même dose de produit, on obtient une colonie mais qui n'arrive pas à envahir la boîte et dont le développement devient stationnaire à 6 jours. Donc à une dose correspondant à 3 fois celle préconisée, ce produit semble peu efficace. JB75 semble donner des résultats plus cohérents avec les doses efficaces annoncées par le fabricant. En effet, *T. viride* est totalement inhibé par ce produit à la concentration de 20 g/l. À cette dose, la croissance de *G. virens* est fortement ralentie pour devenir nulle à 30 g/l (Fig. 2).

Les études en microplaques (milieu liquide) permettent de déterminer la CMI et CML de chaque produit pour chaque espèce fongique. Dans ces essais, l'ensemencement initial est moins massif que précédement et il s'agit de spores, les conditions sont donc plus proches de la réalité.

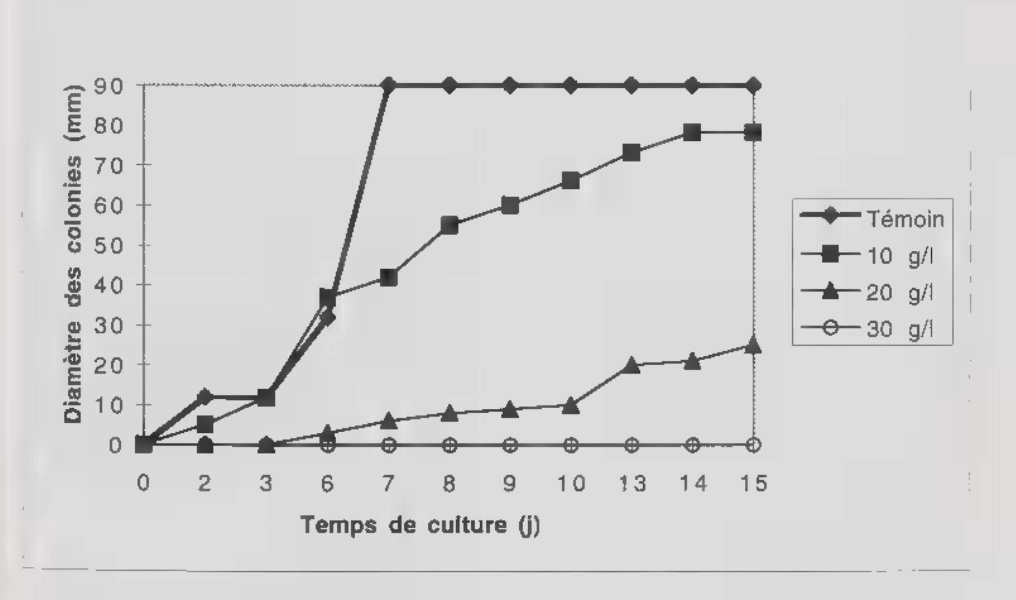


Fig. 2. — Croissance de *Glyocladium virens* sur milieu solide en présence de différentes concentrations de JB75.

Fig. 2. — Growth of *Gliocladium virens* on solid medium with variable concentrations of JB75.

Le PEG a un effet inhibiteur très net sur certaines des espèces étudiées (Fig 3), par contre ce produit n'a pas d'effet fongicide propre. Il a déjà été signalé que les PEG sous forme stable (non dégradée) n'ont pas de propriétés biocides effectives bien qu'ils empêchent le développement bactérien. Cet effet est supposé résulter d'un phénomène de compétition avec l'eau et les nutriments. Par contre, sous l'influence de rayonnements (UV, gamma...) ou en présence de traces de certains ions métalliques, les PEG peuvent se décomposer en différents produits (aldéhydes...) qui pourraient avoir une action biostatique ou même biocide (Brownstein, 1981).

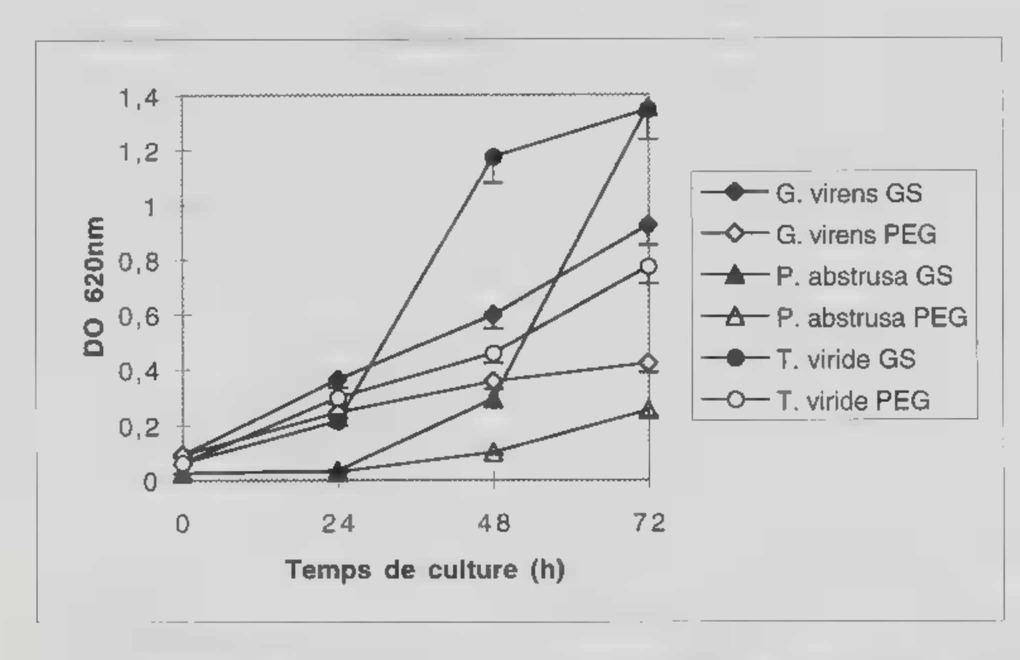


Fig. 3. — Influence du polyéthylène glycol sur la croissance des micromycètes en milieu liquide de Galzy & Slonimski (1957).
GS : milieu de Galzy et Slonimski ; PEG : milieu de Galzy et Slonimski additionné de 20 % de PEG 400.

Fig. 3. – Effect of polyethylene glycol on growth of micromycetes in liquid medium of Galzy & Slonimski (1957).
GS: Galzy & Slonimski's medium; PEG Galzy & Slonimski's medium with 20% PEG 400.

En présence des biocides, le PEG a des effets variables qui dépendent du biocide et de l'espèce fongique. Les tableaux 1 à 3 donnent les valeurs de CMI et CML obtenues. Le PCPNa est un inhibiteur très efficace entre 10 et 200 mg/l selon l'espèce (moyenne 70 mg/l). Il a une action fongicide entre 10 mg/l et 1 g/l (moyenne 250 mg/l), *Chaetomium globosum* et *Trichoderma viride* sont très résistants. Pour les autres espèces, la fourchette CMI-CML est très réduite. La présence de PEG dans le milieu de culture inhibe assez fortement l'activité du PCPNa sauf dans le cas de *Chaetomium globosum*. Les valeurs moyennes des CMI et CML sont très augmentées ainsi que l'écart entre CMI et CML

sauf pour *Chaetomium globosum et Trichoderma viride.* Le JB75 est un fongistatique efficace (CMI moyenne : 4,40 g/l), par contre les valeurs de CML sont supérieures ou égales à 50 g/l (dose maximale d'utilisation recommandée) pour plusieurs espèces. Deux espèces sont très sensibles et ne présentent que peu d'écart entre CMI et CML, ce sont *Pholiota abstrusa* et *Phialophora lignicola.* Par contre *Chaetomium globosum* est très resistant. La présence de PEG augmente la résistance (CML) de *Phialophora lignicola*, mais n'a aucun effet sur le comportement des autres espèces vis à vis de JB75. Luxor se montre un fongistatique et un fongicide efficace, on note cependant une CML élevée pour *Chaetomium globosum* et *Penicillium chrysogenum*, et globalement il y a un écart non négligeable entre les CMI et les CML. Le PEG a un effet variable, diminuant les CML pour *Pholiota abstrusa, Gliocladium virens* et *Phialophora lignicola*, tandis qu'il protège *Trichoderma viride.* Le Kathon CG, le B48 et le B66 donnent des résultats comparables ce qui est logique puisqu'ils contiennent le même type de principes actifs. Ces produits sont efficaces aussi bien comme fongistatiques que comme fongicides et on observe un écart réduit entre CMI et CML. Cependant les doses efficaces sont souvent supérieures à celles préconisées par le fabricant et *Chaetomium globosum* se montre très résistant. La présence de PEG entraine une diminution de la CML pour *Acremonium persicinum, Pholiota abstrusa* et *Penicillium chrysogenum* avec B48, pour *Acremonium persicinum* et *Gliocladium virens* avec B66 et pour *Gliocladium virens* et Phialophora lignicola avec Kathon CG. Par contre, le PEG augmente la résistance de *Gliocladium virens* vis à vis de B48 et celle de *Penicillium chrysogenum* avec Kathon CG.

En conclusion, sur les 5 solutions biocides commerciales testées 4 se révèlent des fongistatiques et fongicides efficaces ; cependant le plus performant reste le PCPNa choisi comme référence tandis que le JB75 est surtout un fongistatique. Les petites différences observées entre les 3 produits à base d'isothiazolines (B48, B66 et Kathon CG) peuvent être attribuées à une différence de structure du principe actif, la présence d'adjuvants différents ou bien à une différence de dosage pour Kathon CG et B48. Toutefois, dans ce dernier cas, l'activité est peu modifiée alors que Kathon CG est dosé au 1/10 par rapport à B48. Ceci est intéressant au plan des problèmes de toxicité, donc de retraitement et d'élimination des résidus.

Malgré ses performances, plusieurs éléments sont en défaveur du PCPNa : sa toxicité et une inhibition très nette de son activité en présence de PEG. L'interférence du PEG se produit de façon beaucoup moins systématique avec les autres biocides.

Il est important d'établir le plus précisément possible un inventaire de la microflore (algues, bactéries, micromycètes) pour choisir le ou les biocides les mieux adaptés et les doses à utiliser car certaines espèces fongiques peuvent se montrer très résistantes aux traitements ; par exemple *Chaetomium globosum* avec tous les produits ou encore *Penicillium chrysogenum* et *Phialophora lignicola* avec Luxor. De plus, ce choix doit aussi tenir compte des autres traitements infligés au pièces de bois ; en particulier l'emploi de PEG qui peut avoir aussi bien un effet bénéfique que néfaste selon les espèces fongiques et le biocide utilisé.

	JB75		JB75 PEG		PCPNa		PCPNa PEG	
	CMI	CML	CMI	CML	CMI	CML	CMI	CML
Ascomycète								
Chaetomium globosum	1,0	> 60,0	1,0	> 60,0	0,20	1,0	0,75	0,75
Basidiomycète								
Pholiota abstrusa	1,0	1,0	1,0	1,0	0,10	0,10	0,20	0,30
Deutéromycètes								
Acremonium persicinum	3,0	5,0	1,0	5,0	0,01	0,01	0,20	0,50
Gliocladium virens	5,0	60,0	10,0	60,0	0,10	0,10	0,05	3,0
Penicillium chrysogenum	10,0	50,0	10,0	40,0	0,02	0,02	0,20	0,20
Phialophora lignicola	1,0	1,0	5,0	60,0	0,01	0,01	0,30	3,0
Trichoderma viride	10,0	60,0	25,0	60,0	0,05	0,50	0,75	1,0
VALEURS MOYENNES	4,40	33,85	7,60	40,85	0,07	0,25	0,35	1,25

Tableau 1. — Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales létales (CML) de JB75 et PCPNa (en g/l) sur 7 espèces fongiques cibles cultivées en milieu liquide de Galzy & Slonimski (1957) avec et sans polyethylène glycol pendant 72 h à 22° C.

Table 1. – Minimal inhibitory concentrations (CMI) and minimal lethal concentrations (CML) of JB75 and PCPNa (g/l) on 7 fungal species cultivated in liquid medium of Galzy & Slonimsky (1957) with or without polyethylene glycol during 72 h at 22° C.

	Kathon		Kathon PEG		Luxor		Luxor [redacted]	
	CMI	CML	CMI	CML	CMI	CML	CMI	CML
Ascomycète								
Chaetomium globosum	0,05	3,0	0,10	3,0	0,05	> 3,0	0,10	> 3,0
Basidiomycète								
Pholiota abstrusa	0,01	0,05	0,01	0,01	0,01	0,05	0,01*	0,01
Deutéromycètes								
Acremonium persicinum	0,10	0,20	0,01	0,30	0,10	0,20	0,01	0,20
Gliocladium virens	0,50	0,75	0,01	0,20	0,20	0,50	0,01	0,10
Penicillium chrysogenum	0,30	0,30	0,20	0,75	0,20	3,0	0,30	3,0
Phialophora lignicola	0,10	0,10	0,01	0,05	0,05	3,0	0,01	0,30
Trichoderma viride	0,30	0,30	0,05	0,30	0,30	0,50	0,01	0,75
VALEURS MOYENNES	0,20	0,70	0,05	0,70	0,15	1,45	0,06	1,0

Tableau 2. — Concentration minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales létales (CML) de Kathon CG et Luxor D2 (en g/l) sur 7 espèces fongiques cibles cultivées en milieu liquide de Galzy & Slonimski (1957) avec et sans polyethylène glycol pendant 72 h à 22° C;

Table 2 — Minimal inhibitory concentrations (CMI) and minimal lethal concentrations (CML) of Kathon CG and Luxor D2 (g/l) on 7 fungal species cultivated in liquid medium of Galzy & Slonimski (1957) with or without polyethylene glycol during 72 h at 22° C.

	B48		[redacted] PEG		B66		B66 PEG	
	CMI	CML	CMI	CML	CMI	CML	CMI	CML
Ascomycète								
Chaetomium globosum	0,10	> 3,0	0,10	> 3,0	0,20	3,0	0,20	> 3,0
Basidiomycète								
Pholiota abstrusa	0,10	0,10	0,05	0,05	0,10	0,10	0,10	0,10
Deutéromycètes								
Acremonium persicinum	0,20	0,20	0,05	0,05	0,10	0,10	0,05	0,05
Gliocladium virens	0,20	0,30	0,20	3,0	0,20	1,0	0,20	0,50
Penicillium chrysogenum	0,10	0,50	0,20	0,20	0,10	0,10	0,05	0,10
Phialophora lignicola	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,10
Trichoderma viride	0,10	0,30	0,10	0,30	0,02	1,0	0,10	0,75
VALEURS MOYENNES	0,12	0,65	0,10	0,95	0,10	0,75	0,10	0,65

Tableau 3 — Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimamles létales (CML) de B48 et B66 (en g/l) sur 7 espèces fongiques cibles cultivées en milieu liquide de Galzy & Slonimski (1957) avec et sans polyethylène glycol pendant 72 h à 22° C.

Table 3 — Minimal inhibitory concentrations (CMI) and minimal lethal concentrations (CMI) of B48 and B66 (g/l) on 7 frugal species cultivated in liquid medium of Galzy & Slonimski (1957) with or without polyethylene glycol during 72 h at 22°C.

RÉFÉRENCES

BROWSTEIN A., 1981 — The chemistry of polyethylene glycol. *Proceedings of the ICOM Waterlogged Wood Working Group Conference, Ottawa (Canada)*, pp. 279-286.

COOK C. & GRATTAN D.W., 1984 — A practical comparative study of treatments for waterlogged wood : part III : pretreatment solutions for freeze-drying. *Proceedings of the 2nd ICOM Waterlogged Wood Working Group Conference, Grenoble (France)*, pp. 219-239.

DE TASSIGNY C. & GINIER-GILLET A., 1979 — La méthode par imprégnation/irradiation gamma. *Revue suisse d'art et d'archéologie* 36 : 138-141.

GINIER-GILLET A., PARCHAS D., RAMIERE R. & TRAN Q.K., 1984 — Méthodes de conservation développées au centre d'étude et de traitement des bois gorgés d'eau (Grenoble — France) : imprégnation par une résine radiodurcissable et lyophilisation. *Proceedings of the 2nd ICOM Waterlogged Wood Working Group Conference, Grenoble (France)*, pp. 125-137.

HOFFMANN P., 1984 — On the stabilization of waterlogged oakwood with PEG molecular size versus degree of degradation. *Proceedings of the 2nd ICOM Waterlogged Wood Working Group Conference, Grenoble (France)*, pp. 95-115.

JANNIERE G. & MEURGUES G., 1984 — Traitement des bois gorgés d'eau par la technique de lyophilisation au Muséum d'Histoire Naturelle. *Proceedings of the 2nd ICOM Waterlogged Wood Working Group Conference, Grenoble (France)*. pp. 175-179.

POINTING S.B., JONES A.M. & JONES E.B.G., 1994 — The potential use of gamma irradiation for improving the long term storage of waterlogged archeological wood. *Proceedings of the 5th ICOM Group on Wet Organic Archeological Materials Conference, Portland (USA)*, pp. 437-451.

YOUNG G.S. & WAINWRIGHT I.N.M., 1982 — Polyethylene glycol treatments for waterlogged wood at the cell level. *Proceedings of the ICOM Waterlogged Wood Working Group Conference, Ottawa (Canada)*, pp. 107-116.